

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-009860

(43)Date of publication of application : 14.01.2003

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

C12M 3/00

C12N 5/06

G01N 33/53

G01N 37/00

(21)Application number : 2001-195425

(71)Applicant : FUJI PHOTO FILM CO LTD

(22)Date of filing : 27.06.2001

(72)Inventor : KAWAMURA KOICHI
YAMAZAKI SUMIAKI**(54) COMPARTMENTED CULTURE SUBSTRATE AND DNA CHIP USING THE SAME****(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a widely applicable compartmented culture substrate capable of easily forming in high sensitivity and resolution on light exposure or heating highly hydrophilic area suitable as cell-nonadhesive area and also capable of pattern formation based on digital data by operating an infrared laser or the like, and to provide an excellent DNA chip capable of easily forming fine patterns.

SOLUTION: This culture substrate has the following structure: the surface of a substrate is provided with a graft layer of a high-molecular compound having functional group whose hydrophilicity/hydrophobicity change by the action of heat, acid or radiation and having a structure directly bindable via chemical bond to the substrate. This culture substrate is characterized in being obtained by irradiating a specified area of the graft layer with radiation or feeding the area with heat or acid to change the hydrophilicity/hydrophobicity of the graft layer surface to compartment the graft layer surface into cell-adhesive area and cell-nonadhesive area.

(19) 日本特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-9860

(P2003-9860A)

(43) 公開日 平成15年1月14日 (2003.1.14)

(51) Int. Cl. ⁷ C 1 2 N 15/00 C 1 2 M 3/00 C 1 2 N 5/00 G 0 1 N 33/53 37/00	識別記号 1 0 2	F I C 1 2 M 3/00 G 0 1 N 33/53 37/00 C 1 2 N 15/00 5/00	テーラード (参考) 4 B 0 2 4 M 4 B 0 2 9 1 0 2 4 B 0 6 5 F E 審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 14 頁)
(21) 出願番号 特願2001-195425 (P2001-195425) (22) 出願日 平成13年6月27日 (2001.6.27)	(71) 出願人 000005201 富士写真フイルム株式会社 神奈川県横浜市中区210番地 (72) 発明者 川村 浩一 静岡県藤原郡吉田町川尻4000番地 富士写真フイルム株式会社内 (72) 発明者 山崎 純男 静岡県藤原郡吉田町川尻4000番地 富士写真フイルム株式会社内 (74) 代理人 100079049 弁理士 中島 淳 (外3名)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 区画増強基板及びそれを用いたDNAチップ

(57) 【要約】

【課題】 露光、加熱により高感度、高解像度で、細胞の非接着領域に好適な高親水性の領域が容易に形成でき、しかも、赤外線レーザ等を操作することによりデジタルデータに基づいたパターン形成が可能な、応用範囲の広い区画増強基板、及び、微細なパターンを容易に形成しうる優れたDNAチップを提供する。

【解決手段】 支持体上に、酸、鹽または放射線により親水性が変化する官能基を有し、且つ、該支持体上に直鎖化学結合により結合されうる構造を有する高分子化合物からなるグラフト層を備え、該グラフト層の所定領域に、加熱、酸の供給または放射線の照射を行って、グラフト層表面の親水性を変化させ、グラフト層表面を細胞接着性領域と細胞非接着性領域に区画してなることを特徴とする。

(2)

特開2003-9860

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 支持体上に、熱、酸または紫外線により親水性が変化する前駆基を有し、且つ、該支持体上に直接化学結合により結合される構造を有する高分子化合物からなるグラフト層を備え、該グラフト層の所定領域に、加熱、酸の供給または紫外線の照射を行って、グラフト層表面の親水性を変化させ、グラフト層表面を細胞接着性領域と細胞非接着性領域に区画してなることを特徴とする区画培養基板。

【請求項2】 前記熱、酸または紫外線により親水性が変化する前駆基を有し、且つ、該支持体上に直接化学結合により結合される構造を有する高分子化合物が、高分子鎖の末端で直接化学結合により該支持体表面に結合されている直鎖状高分子化合物であるか、もしくは、高分子鎖の末端で高分子化合物を介して化学的結合により該支持体表面に結合されている直鎖状高分子化合物であることを特徴とする請求項1に記載の区画培養基板。

【請求項3】 前記加熱、酸の供給または紫外線の照射を行った後のグラフト層表面における親水性領域が、細胞接着性領域であることを特徴とする請求項1に記載の区画培養基板。

【請求項4】 請求項1乃至請求項3に記載の区画培養基板にDNAを固定化したものをDNAチップ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は区画培養基板に関し、特に、細胞やDNAを吸着させる領域の大きさや形状を容易に固定化する区画培養基板及びそれを用いて得られるDNAチップに関する。

【0002】

【従来の技術】現在、種々の目的で細胞培養或いは細胞培養が行われており、また、新たな細胞の培養法も開発されている。特に細胞培養は、生化学的現象や性質の解明、有用な物質の生産などの目的で広く利用されており、さらに、培養細胞を用いて、人工的に合成された薬剤の生体活性や毒性を調べる試みもなされている。多くの動物細胞は、何かに接着して生育する接着依存性を有しており、このような接着依存性を有した細胞の培養には、細胞が接着するための担体が必要である。担体としては、一般的には、コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞接着性タンパク質が用いられ、これらを均一に塗布したプラスチック製の培養皿が用いられている。

【0003】一方、目的に応じて、培養細胞を板上の微小部分にのみ接着させ、配列させる技術が報告されている。このような技術により、培養細胞を人工臓器やバイオセンサ、バイオリアクターなどに応用することが可能になる。培養細胞を配列させる方法としては、細胞に対して接着の容易さが異なるようなグラフト層がパターンをなしているような区画培養基板を用い、細胞が接

2

着しやすい領域を形成し、その表面だけに細胞を接着させることで、区画培養を可能とし、所望の細胞の配列パターンを形成させる方法がとられ、種々のパターン形成法が提案されている。

【0004】例えば、特開平2-245181号公報には、細胞状態に神経細胞を増殖させるなどの目的で、神経前駆細胞を形成させた電荷保持媒体を細胞培養に用いている。また、特開平3-7577号公報では、細胞非接着性表面を有した細胞培養材料に紫外線や放射線を照射することによって細胞接着性の官能基を導入したり、細胞培養材料に紫外線や放射線を照射することによって重合開始剤を誘導し、この上に細胞接着性あるいは細胞非接着性モノマーを重合させるなどして表面をパターンニングし、これによって細胞の配列を制御する方法が提案されている。さらに、特開平3-7578号公報では、細胞非接着性あるいは細胞接着性の光感受性親水性高分子を、特開平5-176753号公報では、細胞の接着率や形態に影響を与えるコラーゲンなどの物質を、いずれもフォトリソグラフィ法によってパターンニングする細胞培養用基板が開示されている。

【0005】このように任意の区画パターンを有する培養基板は、種々の分野に应用が可能なため、前述の生化学的現象の解析、有用な物質の生産などの他、細胞を用いた超小型バイオセンサ、スイッチング素子、バイオリアクター、ハイブリッド型人工臓器、さらにはニューロコンピュータへの応用も可能であり、さらに、近年注目されているDNAチップにも適用することができる。

【0006】従来の一般的なパターン形成方法、例えば、コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞接着性タンパク質を吸着させて細胞接着領域を形成する場合、第1に所望のミクロパターンを形成するための困難で、タンパク質の接着領域と非接着領域の界面がクリアに区画しにくく、第2に細胞接着性タンパク質が、培養細胞に作用して、細胞の形態に影響を与える可能性があり、用途が限定されるという問題を有している。また、このような細胞接着性タンパク質を用いず、基材にフォトリソグラフィ法によるパターンニングで細胞の接着領域、非接着領域を作成する場合には、細胞非接着性の領域では安定性と導線の観点から、高い親水性とその持続性が求められているが、従来の親水性高分子では、前記二つの特性を満足するものは限られている。特に区画培養基板をDNAチップに用いる場合、500nm以下、好ましくは10～200nm程度の解度が必要とされ、このような高解度のパターン形成が可能で、且つ、高い持続性に優れた親水性領域を形成することが、精度の高い区画培養には必須の技術であるが、実用上満足するレベルのものは未だ得られていないのが現状である。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】上記従来の技術の欠点

(3)

特開2003-9860

3

を考慮してなされた本発明の目的は、露光或いは加熱により高感度、高解像度で、細胞の非接着領域に好適な高親水性の領域が容易に形成でき、しかも、赤外線レーザ等を操作することによりデジタルデータに基づいたパターン形成が可能な、応用範囲の広い区画培養基板及び、微細なパターンを容易に形成しうる優れたDNAチップを提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、鋭意検討した結果、露光、加熱、赤外線レーザの照射により表面の特性が変化する高分子化合物を応用することで上記目的が達成されることを見だし本発明を完成するに至った。すなわち、本発明の区画培養基板は、支持体上に、熱、酸または精射線により親疎水性が変化する官能基を有し、且つ、該支持体上に直接化学結合により結合されうる構造を有する高分子化合物からなるグラフト層を備え、該グラフト層の所定領域に、加熱、酸の供給または精射線の照射を行って、グラフト層表面の親疎水性を変化させ、グラフト層表面を細胞接着性領域と細胞非接着性領域に区画してなることを特徴とする。

【0009】ここで、前記熱、酸または精射線により親疎水性が変化する官能基を有し、且つ、該支持体上に直接化学結合により結合されうる構造を有する高分子化合物が、高分子鎖の末端で直接化学結合により該支持体表面に結合されている直鎖状高分子化合物であるか、もしくは、高分子鎖の末端で高分子化合物を介して化学的結合により該支持体表面に結合されている直鎖状高分子化合物であることが好ましい。本発明においては、加熱、酸の供給または精射線の照射を行った後のグラフト層表面における疎水性領域が、細胞接着性領域として機能することになる。また、本発明の請求項4に係るDNAチップは、前記の区画培養基板にDNAを固定化してなることを特徴とする。

【0010】本発明の区画培養基板は、その表面に、熱、酸または精射線により親疎水性が変化する官能基（以下、適宜、極性変換基と称する）を有する高分子化合物の表面の極性に応じて、露光を含む精射線照射領域、加熱照射領域に選択的に親水性或いは疎水性の区画が形成されるため、基盤の面積に係わらず、デジタルデータに基づき高解像度のパターン形成が可能となる。区画培養基板のグラフト層に用いられる極性変換基を有する高分子化合物は、例えば、その末端で直接または高分子化合物を介して支持体に結合しており、形成される親水性領域は高い強度と耐腐蝕性を示すことになる。さらに、本発明においては、親水性・疎水性を決定する極性変換基は、運動性の高いグラフト鎖構造を有するため、公知の一般的な架橋高分子鎖による親水性領域における水分子との親和性と比較して、水分の吸着速度が極めて早く、単位面積当りに保持しうる水分量が多くなり、高い親水性を発現し、先に述べたその耐久性と合わせ

4

て、細胞非接着領域としての機能に優れ、高解像度の細胞の接着パターンを作成しうるという特徴を有する。

【0011】

【発明の実施の形態】以下に、本発明の区画培養基板について詳細に説明する。本発明の区画培養基板の特徴である、親疎水性が変化する官能基を有する高分子鎖の末端が直接もしくは高分子を介して支持体表面に化学的に結合された表面を作成するための手段について説明する。

10 【表面グラフト重合】本発明に係る区画培養基板は、一般的に表面グラフト重合と呼ばれる手段をもちいて作成される。グラフト重合とは高分子鎖上に活性種を与え、これによって重合を開始する別の単量体をさらに重合させ、グラフト（接ぎ木）重合体を合成する方法で、特に活性種を与える高分子化合物が固体表面を形成する時には表面グラフト重合と呼ばれる。

20 【0012】本発明を実現するための表面グラフト重合法としては文献記載の公知の方法をいずれも使用することができる。たとえば、新高分子実用10、高分子学会編、1994年、共立出版（株）発行、P13には表面グラフト重合法として光グラフト重合法、プラズマ照射グラフト重合法、が記載されている。また、プラズマ照射法、NTS（株）、竹内監修、1999、2発行、p203、p695には、γ線、電子線などの放射線照射グラフト重合法が記載されている。光グラフト重合法の具体的方法としては特開10-296895号公報および特開11-194113号公報に記載の方法を使用することができる。

30 【0013】高分子化合物鎖の末端が直接に化学的に結合された表面グラフト層を作成するための手段としてはこれらの他、高分子化合物鎖の末端にトリアルコキシシリル基、イソシアネート基、アミノ基、水酸基、カルボキシル基などの反応性官能基を付与し、これと支持体表面に存在する官能基とのカップリング反応により形成することもできる。なお、本発明における支持体表面とは、その表面に、極性変換基を有する高分子化合物の末端が直接または高分子化合物を介して化学的に結合する機能を有する表面を示すものであり、支持体自体がこのような表面特性を有するものであってもよく、また該支持体上に別途中間層を設け、該中間層がこのような特性を有するものであってもよい。

40 【0014】また、極性変換基を有する高分子化合物鎖の末端が高分子化合物を介して化学的に結合された表面を作成するための手段としては、支持体表面官能基とカップリング反応しうる官能基を高分子分子の鎖頭に付与し、グラフト鎖として親疎水性が変化する官能基を有する高分子化合物鎖を組み込んだグラフト高分子化合物を合成し、この高分子と下層表面官能基とのカップリング反応により形成することもできる。

50 【0015】（親疎水性が変化する官能基）次に、本発

(4)

特開2003-9860

5

明の区画換置基の特徴の一つである。熱、酸または辐射線により親水性が変化する官能基（活性変換基）について説明する。活性変換基としては、親水性から親水性に変化する官能基と、親水性から疎水性に変化する官能基の2種類がある。

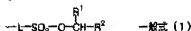
【0016】（疎水性から親水性に変化する官能基）疎水性から親水性に変化する官能基としては、文献記載の公知の官能基を挙げることができる。これらの官能基の有用な例は、特開平10-282672号公報に記載のアルキルスルホン酸エステル、ジスルホン、スルホンイミド、EPO652483、WO92/9934記載のアルコキシアルキルエステル、H. Itoら著、Macromolecules, vol.21, pp.147記載の1-ブチルエステル、その他、シリルエステル、ビニルエステルなどの文献記載の酸分解性基で保護されたカルボン酸エステルなどを挙げることができる。

【0017】また、角岡正弘著、「表面」vol.133(1995)、pp.374記載のイミズルホネート基、角岡正弘著、Polymer preprints, Japan vol.46(1997)、pp.204記載のδ-ケトンスルホン酸エステル類、山岡亜希著、特開昭63-257750号のエトペンジルスルホネート化合物も挙げることができるが、これらの官能基に限定される訳ではない。これらのうち、特に保れているのは下記に示される2級のアルキルスルホン酸エステル基、3級のカルボン酸エステル基、および下記に示されるアルコキシアルキルエステル基である。

【0018】本発明において、疎水性から親水性に変化する官能基として特に保れている2級のアルキルスルホン酸エステル基としては、下記一般式(1)で表されるものである。

【0019】

【化1】



【0020】（一般式(1)式中、Lはポリマー骨格に連結するのに必要なる多価の非金属原子から成る有機基を表す。R¹、R²は置換もしくは非置換アルキル基を表す。また、R¹、R²はそれが結合している2級炭素原子（CH）と共に環を形成してもよい。）

【0021】前記一般式(1)のR¹、R²は置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換アリール基を表す。また、R¹、R²はそれが結合している2級炭素原子（CH）と共に環を形成してもよい。R¹、R²が置換もしくは非置換アルキル基を表すとき、アルキル基としてはメチル基、エチル基、イソプロピル基、1-ブチル基、シクロヘキシル基などの直鎖状、分岐状もしくは環状のアルキル基が挙げられ、炭素数1から25までのものが好適に用いられる。R¹、R²が置換もしくは非置換アリール基を表すとき、アリール基には炭素環式アリール

6

ル基と複素環式アリール基が含まれる。炭素環式アリール基としてはフェニル基、ナフチル基、アントラセニル基、ピレニル基など炭素数6から19のものを用いられる。また、複素環式アリール基としてはピリジル基、フリル基、その他ベンゼン環に環接したキノリル基、ベンゾフリル基、チオキサントニル基、カルバゾール基などの炭素数3〜20、ヘテロ原子数1〜5を含むものを用いられる。

【0022】R¹、R²が置換アルキル基、置換アリール基であるとき、置換基としてはメトキシ基、エトキシ基などの炭素数1〜10までのアルコキシ基、フッ素原子、塩素原子、臭素原子などのハロゲン原子、トリフルオロメチル基、トリクロロメチル基のようなハロゲン置換されたアルキル基、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、1-ブチルオキシカルボニル基、p-クロロフェニルオキシカルボニル基などの炭素数2から15までのアルコキシカルボニル基またはアリールオキシカルボニル基；水酸基；アセチルオキシ、ベンゾイルオキシ、p-ジフェニルアミノベンゾイルオキシなどのアシルオキシ基；1-ブチルオキシカルボニルオキシ基などのカルボネート基；1-ブチルオキシカルボニルメチルオキシ基、2-ヒラニルオキシ基などのエーテル基；アミノ基、ジメチルアミノ基、ジフェニルアミノ基、モルフォリノ基、アセチルアミノ基などの置換、非置換のアミノ基；メチルチオ基、フェニルチオ基などのチオエーテル基；ビニル基、ステリル基などのアルケニル基；エトキシ基；シアノ基；ホルミル基、アセチル基、ベンゾイル基などのアシル基；フェニル基、ナフチル基のようなアリール基；ピリジル基のようなヘテロアリール基等を挙げることができる。また、R¹、R²が置換アリール基であるとき、置換基としては、前述したものの他にメチル基、エチル基などのアルキル基を用いることができる。

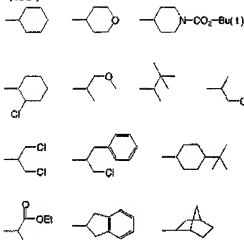
【0023】上記のR¹、R²としては、疎水性に優れる点で、置換、非置換のアルキル基が好ましく、疎水性安定性の点で、アルコキシ基、カルボニル基、アルコキシカルボニル基、シアノ基、ハロゲン基などの電子吸引性で置換されたアルキル基、もしくはシクロヘキシル基、ノルボルニル基などのアルキル基が特に好ましい。例示として、重クロロホルム中、プロトンNMRにおける2級メチン水素のケミカルシフトが4.4 ppmよりも低磁場に現れる化合物が好ましく、4.6 ppmよりも低磁場に現れる化合物がより好ましい。このように、電子吸引性基で置換されたアルキル基が特に好ましいのは、熱分解反応時に中間体として生成していると思われるカルボカチオンが電子吸引性基により不安定化し、分解が抑制されるためであると考えられる。具体的には、-CH(R¹)R²の構造としては、下記式で表される構造が特に好ましい。

【0024】

(5)

特開2003-9860

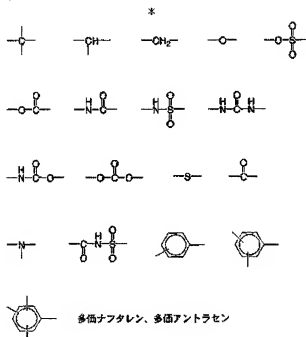
【化2】



*【0025】また、前記一般式(1)のLで表される非金属原子からなる多価の連結基とは、1から6個までの炭素原子、0個から10個までの窒素原子、0個から50個までの酸素原子、1個から100個までの水素原子、及び0個から20個までの硫黄原子から成り立つものである。より具体的な連結基としては下記の前記単位が組み合わさって構成されるものを挙げることができる。

【0026】

10 【化3】



【0027】多価の連結基が置換基を有する場合、置換基としてはメチル基、エチル基等の炭素数1から20までのアルキル基、フェニル基、ナフチル基等の炭素数6から16までのアリール基、水酸基、カルボキシル基、スルホンアミド基、N-スルホンアミド基、アセトキシ基のような炭素数1から6までのアルコキシ基、メトキシ基、エトキシ基のような炭素数1から6までのアルコキシ基、塩素、臭素のようなハロゲン原子、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、シクロヘキシルオキシカルボニル基のような炭素数2から7までのアルコキシカルボニル基、シアン基、メーチルカーボネ

40 ートのような炭酸エステル基等を用いることができる。

【0028】本発明において、疎水性から親水性に変化する官能基として特に優れているアルコキシアルキルエステル基としては、下記一般式(2)で表されるものである。

【0029】

【化4】



50 【0030】式中R'は水素原子を表し、R''は水素原子

(6)

特開2003-9860

9

10

または炭素数18個以下のアルキル基を表し、R'は炭素数18個以下のアルキル基を表す。また、R'、R'およびR'の内の2つが結合して環を形成してもよい。特に、R'およびR'が結合して5または6員環を形成することが好ましい。

【0031】以上、本発明における疎水性から親水性に本

*変化する官能基としては、一般式(1)で表される2級のアルキルスルホン酸エステル基が特に好ましい。前記一般式(1)～(2)で表される官能基(官能基(1)～(13))の具体例を以下に示す。

【0032】

【化5】

(1)



(2)



(3)



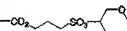
(4)



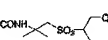
(5)



(6)



(7)



(8)



(9)

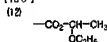
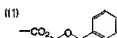


(10)



【0033】

※ ※ 【化6】



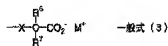
(13)



【0034】(親水性から疎水性に変化する官能基)本発明において、熱、酸または塩析剤により親水性から疎水性に変化する官能基としては、公知の官能基 例えは、特開平10-296895号及び米国特許第6,190,836号に記載のオニウム塩を含むポリマー、特にアンモニウム塩を含むポリマーを挙げることができる。具体的なものとして、(メタ)アクリロキシアルキルトリメチルアンモニウムなどを挙げることができる。また、下記一般式(3)で示されるカルボン酸およびカルボン酸塩基が好適なものとして挙げられるが、これらの例示に特に限定されるものではない。

【0035】

【化7】



【0036】(式中、Xは-O-、-S-、-Se-、-NR'-、-CO-、-SO-、-SO₂-、-PO-、-Si(R'¹)₂-、-CS-を表し、R⁹、R'¹、R⁸、R'は各々独立して1個の基を表し、Mは陽電荷を有するイオンを表す。)

R⁹、R'¹、R⁸、R'の具体例としては -F、-Cl、-Br、-I、-CN、-R¹⁰、-OR¹⁰、-OOR¹⁰、-OCOR¹⁰、-CONR¹⁰R¹¹、-OSO₂R¹⁰、-COR¹⁰、-COOR¹⁰、-CONR¹⁰R¹²、-NR¹⁰R¹³、-NR¹⁰-COR¹¹、-NR¹⁰-COOR¹¹、-NR¹⁰-CONR¹¹R¹³、-SR¹⁰、-SOR¹⁰、-SO₂R¹⁰、-SO₂R¹⁰等が挙げられる。R¹⁰、

(7)

特開2003-9860

11

R¹¹、R¹²は、それぞれ水素原子、アルキル基、アリール基、アルケニル基、又はアルキニル基を表す。

【0037】これらのうち、R¹、R^{1'}、R⁴、R⁷として好ましいのは、具体的には、水素原子、アルキル基、アリール基、アルキニル基、アルケニル基である。Mの具本

(14)



12

* 体例としては、前述のような降電荷を有するイオンが添えられる。前記一般式(3)で表される官能基の具体例(官能基(14)～(31))を以下に示す。

【0038】

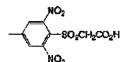
【化8】



(15)



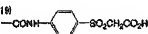
(17)



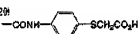
(18)



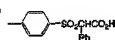
(19)



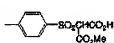
(20)



(21)



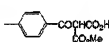
(22)



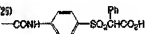
(23)



(24)



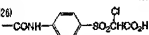
(25)



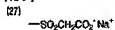
【0039】

※30※ 【化9】

(26)



(27)



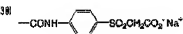
(28)



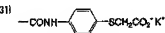
(29)



(30)



(31)



【0040】本発明における極性変換基を有する高分子化合物は、上記のような官能基を有するモノマー1種の単独重合体であっても、2種以上の共重合体であっても良い。また、本発明の効果を損なわない限り、他のモノ

マーとの共重合体であっても良い。なお、上記のような官能基を有するモノマーの具体例を以下に示す。

(前記一般式(1)～(2)で表される官能基を有するモノマーの具体例【例モノマー(M-1)～(M-1

59

5)))
[0 0 4 1]

13

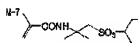
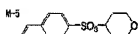
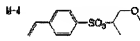
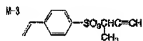
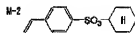
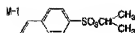
(8)

特開2003-9860

14

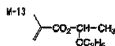
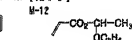
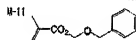
* [化10]

*



[0 0 4 2]

* [化11]



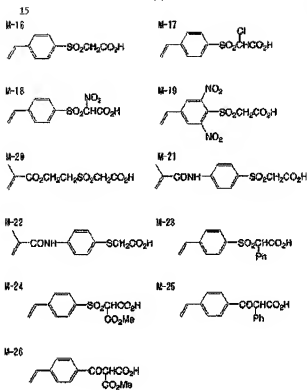
[0 0 4 3] (前記一般式(3)で表される官能基を有するモノマーの具体例(例示モノマー(M-16)~(M-33))

[0 0 4 4]
[化12]

(9)

特開2003-9860

16

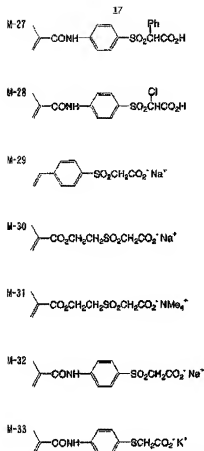


[0045]

[413]

(10)

特開2003-9860



【0046】〔支持体表面〕本発明の区画培養基板は、前述の極性変換基を有する高分子化合物の末端が直接または高分子化合物を介して化学的に結合した表面グラフト層と該高分子化合物の末端が直接または高分子化合物を介して化学的に結合できるような支持体表面を有するものである。先に述べたように、支持体の表面自体がこのような特性を有していてもよく、このような特性を有する中間層を支持体表面に設けてもよい。

【0047】〔支持体表面或いは中間層〕このような支持体表面は、前記表面グラフト層をグラフト台成して設けるのに適した特性を有していれば、無機層、有機層のいずれでもよい。また本発明においては、薄層の高分子化合物からなる画像形成層により親水性の変化を発現するため表面の極性は問題ではなく、親水性であってもまた疎水性であってもよい。このような中間層においては、特に、光グラフト重合法、プラズマ照射グラフト重合法、放射線照射グラフト重合法により本発明の層ポリマーを合成する場合には、有機表面を有する層であることが好ましく、特に有機ポリマーの層であることが好ましい。また有機ポリマーとしてはエポキシ樹脂、アクリル樹脂、ウレタン樹脂、フェノール樹脂、スチレン系樹脂、ビニル系樹脂、ポリエステル樹脂、ポリアミド系

樹脂、メラミン系樹脂、フォルマリン樹脂などの合成樹脂、ゼラチン、カゼイン、セルロース、デンプンなどの天然樹脂のいずれも使用することができるが、光グラフト重合法、プラズマ照射グラフト重合法、放射線照射グラフト重合法などではグラフト重合の開始が有機ポリマーの水系の引き抜きから進行するため、水系が引き抜かれずポリマー、特にアクリル樹脂、ウレタン樹脂、スチレン系樹脂、ビニル系樹脂、ポリエステル樹脂、ポリアミド系樹脂、エポキシ樹脂などを使用することが、特に製造適性の点で好ましい。このような中間層は、後述の基板（支持体）を兼ねていてもよく、また必要に応じて支持体上に設けられた中間層であってもかまわない。

【0048】また、本発明の画像形成材料においては、極性変換基を有するグラフト層の形成性、支持体との密着性の観点から、調剤高分子化合物が直接化学結合している支持体として、形成されるパターンの解像度への影響を及ぼさない範囲においてその表面が粗面化されているものを用いることもできる。粗面化した支持体を用いる場合には、その表面性状は以下の条件を満たすものであることが好ましい。粗面化された支持体の好ましい状態としては、2次元粗さパラメータの中心線平均粗さ（ R_a ）が0.1～1 μm 、最大高さ（ R_y ）が1～10 μm 、十点平均粗さ（ R_z ）が1～10 μm 、凹凸の平均間隔（ S_m ）が5～80 μm 、局部山頂の平均間隔（ S ）が5～80 μm 、最大高さ（ R_t ）が1～10 μm 、中心線山高さ（ R_p ）が1～10 μm 、中心線谷深さ（ R_v ）が1～10 μm の範囲が挙げられ、これらのひとつ以上の条件を満たすものが好ましく、全てを満たすことがより好ましい。

【0049】〔光熱変換物質〕なお、本発明の区画培養基板上にレーザーなどでパターン形成を行う場合には、該光エネルギーを熱エネルギーに変換するための光熱変換物質を区画培養基板のどこかに含有させておくことが好ましい。光熱変換物質を含有させておく部分としては、例えば、親/疎水性が変化するグラフト層、中間層、支持体基板のいずれでもよく、さらに、中間層と支持体基板との間に光熱変換層を設け、そこに添加してもよい。

【0050】本発明の区画培養基板に用い得る光熱変換物質としては、紫外線、可視光線、赤外線、白色光線等の光を吸収して熱に変換し得る物質ならば全て使用できるが、培養する細胞、細胞膜、DNAなどへの影響を考慮して選択することが好ましい。用い得る光熱変換剤としては、例えば、カーボンブラック、カーボングラファイト、顔料、フタロシアニン系染料、鉄粉、黒鉛粉末、酸化鉄粉、酸化鉛、酸化銀、酸化クロム、酸化鉄、硫化クロム等が挙げられる。本発明において特に好ましいのは、書き込みに使用する赤外線レーザーの露光波長である760nmから1200nmに極大吸収波長を有する炭

(11)

特開2003-9860

19

料、顔料または金属微粒子である。

【0051】染料としては、市販の染料及び文献（例えば「染料便覧」有機合成化学協会編、昭和45年刊）に記載されている公知のもので利用できる。具体的には、アゾ染料、金属錯塩アゾ染料、ピラゾロンアゾ染料、アントラキノン染料、フタロシアニン染料、カルボニウム染料、キノイン染料、メチン染料、シアニン染料、金属チオレート錯体等の染料が挙げられる。好ましい染料としては、例えば、特開昭58-125246号、特開昭59-84356号、特開昭59-202829号、特開昭60-78787号等に記載されているシアニン染料、特開昭58-173696号、特開昭58-181690号、特開昭58-194595号等に記載されているメチン染料、特開昭58-112793号、特開昭58-224793号、特開昭59-48187号、特開昭59-73996号、特開昭60-52940号、特開昭60-63744号等に記載されているナフトキノン染料、特開昭58-112792号等に記載されているスクワリウム色素、英国特許434、875号記載のシアニン染料等を挙げることができる。

【0052】また、米国特許第5、156、938号記載の近赤外線吸収増感剤も好適に用いられ、また、米国特許第3、881、924号記載の複合アルルベソ（チオ）ピリリウム塩、特開昭57-142645号（米国特許第4、327、169号）記載のトリメチンアピリリウム塩、特開昭58-181051号、同58-220143号、同59-41363号、同59-84248号、同59-84249号、同59-146063号、同59-146061号に記載されているピリリウム系化合物、特開昭59-216146号記載のシアニン色素、米国特許第4、283、475号記載のペンタメチンチオピリリウム塩等や特公平5-13514号、同5-19702号公報に開示されているピリリウム化合物も好ましく用いられる。また、好ましい別の染料の例として、米国特許第4、756、993号明細書中に式（I）、（II）として記載されている近赤外線吸収染料を挙げることができる。これらの染料のうち特に好ましいものとしては、シアニン色素、スクワリウム色素、ピリリウム塩、ニッケルチオレート錯体が挙げられる。

【0053】本発明において使用される染料としては、市販の染料及びカラーインデックス（C.I.）便覧、「最新染料便覧」（日本染料技術協会編、1977年刊）、「最新染料応用技術」（CMC出版、1986年刊）、「印刷インキ技術」（CMC出版、1984年刊）に記載されている染料が利用できる。染料の種類としては、黒色染料、黄色染料、オレンジ色染料、褐色染料、赤色染料、紫色染料、青色染料、緑色染料、蛍光染料、金属微粒子、その他、ポリマー結合色素が挙げられる。具体的には、不溶性アゾ染料、アゾレーキ染料、縮合ア

20

ゾ染料、キレートアゾ染料、フタロシアニン系染料、アントラキノン系染料、ペリレン及びペリレン系染料、チオインジゴ系染料、キナクリドン系染料、ジオキサジン系染料、イソインドリノン系染料、キノフタロン系染料、染付けレーキ染料、アジン染料、ニトロソ染料、ニトロ染料、天然染料、蛍光染料、無機染料、カーボンブラック等が使用できる。これらの染料のうち好ましいものはカーボンブラックである。

【0054】これらの染料又は顔料は、光熱変換物質含有層全面積分の0.01～50重量%、好ましくは0.1～10重量%、染料の場合特に好ましくは0.5～10重量%、顔料の場合特に好ましくは3.1～10重量%の割合で使用することができる。顔料又は染料の添加量が0.01重量%未満であると感度が低くなり、また50重量%を越えると光熱変換物質含有層の膜強度が弱くなる。

【0055】（支持体基板）本発明の区画培養基板に使用され、その表面に前記特性を備えたグラフト層を有する支持体（基板）は、通常的に安定な板状物であることが好ましく、例えば、紙、プラスチック（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン等）がラミネートされた紙、金属板（例えば、アルミニウム、亜鉛、銅等）、プラスチックフィルム（例えば、二酢酸セルロース、三酢酸セルロース、プロピオン酸セルロース、酢酸セルロース、酢酸酢酸セルロース、酢酸酢酸セルロース、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリメタセタル等）、上記の如き金属がラミネート若しくは蒸着された紙若しくはプラスチックフィルム等が含まれる。本発明に使用される支持体としては、ポリエタレンフィルム又はアルミニウム板が好ましく、その中でも、前記下層を兼ねることができるポリエタレンフィルムが特に好ましい。基材として使用するアルミニウム板には必要に応じて前述のような粗面化処理、陽極酸化処理などの公知の表面処理を行なってもよい。

【0056】また、他の好ましい媒体であるポリエタレンフィルム等のプラスチックフィルムを用いる場合には、膜・親水性グラフト層の形成性、密着性の観点から、前述の粗面化処理を施されたものを用いることも可能である。

【0057】なお、本発明の区画培養基板に使用される支持体が、前記中間層を兼ねる場合は、前記中間層において許された樹膠材料からなるフィルムそのものを用いることができる。この場合には、前記のように親・親水性グラフト層を構成する高分子化合物が直接化学結合している支持体表面が粗面化されているものを用いることもできる。

【0058】（パターン形成方法）つぎに、このようにして得られた本発明に係る区画培養基板のパターン形成方法について説明する。本発明の区画培養基板のパター

(12)

特開 2003-9860

21

ン形成機構では、前記グラフト層中の高分子化合物の極性変換基が加熱、または精射線照射領域において極性変換し、親水性域は疎水性の領域が形成される。このとき、加熱、露光領域が疎水性を発現する領域となる場合、そこが細胞非接着性領域となり、非加熱領域、または未露光領域においては、疎水性がそのままの表面状態で残存することになり、細胞接着性領域となる。また、加熱、露光部が疎水性領域となる場合には、そこが細胞接着性領域となり、また、非加熱領域、または未露光領域においては、親水性がそのままの表面状態で残存することになり、細胞非接着性領域となる。ここで、細胞非接着性領域における親水性の程度としては、電荷を有する接触角が90度以下の親水性表面であることが好ましいが、本発明における表面親水領域はいずれも拡張露れを示す程度の高い親水性を有するものである。

【0059】（書き込み）本発明の画像形成材料への画像の書き込みは、光などの相対露線の照射あるいは加熱により行われる。また、光照射の際像として、前記光熱変換材料を併用するタイプであれば、赤外線領域のレーザー光等の定露露光による加熱により、画像形成することも可能である。画像形成に用いる方法としては、加熱、露光等の相対露線照射により書き込みを行う方法が挙げられる。例えば、赤外線レーザー、紫外線ランプ、可視光線などによる光照射、γ線などの電子線照射、サーマルヘッドによる熱的な記録などが可能である。これらの光源としては、例えば、水銀灯、メタルハライドランプ、キセノンランプ、ケミカルランプ、カーボンアーク灯等がある。放射線としては、電子線、X線、イオンビーム、遠赤外線などがある。またg線、i線、Deep-UV光、高密度エキシマレーザー（レーザービーム）も使用される。一般的に用いられる具体的な態様としては、熱記録ヘッド等による直接露線記録、赤外線レーザーによる定露露光、キセノン放電灯などの高照度フラッシュ露光や赤外線ランプ露光などが好適に挙げられる。コンピュータのデジタルデータによるダイレクト画像形成を行うためには、レーザー露光により極性変換を生じさせる方法が好ましい。レーザーとしては、炭酸ガスレーザー、窒素レーザー、Arレーザー、He/Neレーザー、He/Cdレーザー、Krレーザー等の気体レーザー、液体（色素）レーザー、ルビーレーザー、Nd/YAGレーザー等の固体レーザー、GaAs/GaAlAs、InGaAsレーザー等の半導体レーザー、KrFレーザー、XeClレーザー、XeFレーザー、Ar₂等のエキシマレーザー等を使用することができる。なかでも、波長700～1200nmの赤外線を放射する半導体レーザー、YAGレーザー等の固体高出力赤外線レーザーによる露光が好適である。

【0060】（表面グラフト重合の極性）先に具体的に例示した一般式(1)で表されるアルキルシリルエステル基などの知基アニオングラフト極性変換官能基を有するグラフト層では、加熱、露光領域のみが疎水性に

22

ら親水性に変化し、細胞非接着領域を形成する。このようなパターン形成機構を用いる場合には、非加熱、未露光部は極性変換されず、基材のままの疎水性を維持し、細胞接着領域となる。効果の観点からは、非加熱、未露光部領域に細胞接着性の高いカルボキシル基やアミノ基などの官能基を有することが好ましい。この細胞接着性領域は、目的に応じて、そのまま細胞を接着させる方法で用いてもよく、また、細胞接着性を有するペプチド類などの高分子化合物を導入して、その後、目的とする細胞を接着させて用いることもできる。

【0061】前記細胞接着性を有する高分子化合物の具体例としては、例えば、ポリアクリル酸、ポリビニル硫酸、ポリスチレンスルホン酸、ポリアリルアミンなどの電荷を有する高分子化合物、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、デキストラン硫酸、ケラタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヒアルロン酸、キチンなどの電荷を有する多糖類、コラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、D12ロネキチンなどの細胞接着性タンパク質、さらには細胞接着性タンパク質や細胞接着性ペプチドを固定した高分子化合物などがあげられるが、これらに限定されるものではない。

【0062】他のパターン形成機構として、例えば、特開平10-296895号公報に記載のアンモニウム基などの知基カチオングラフト極性変換官能基を有するグラフト層では、もともと表面が正の電荷を有しており、露光あるいは加熱領域のみが電荷を消失するようになる。従って、ここが細胞吸着性の領域となる。

【0063】以上の方で、パターン形成された本発明の区画培養基板は、常法により細胞を培養することにより、細胞配列を容易に制御でき、露光条件によってはサブミクロン（0.3～0.5μm程度）のオーダーまでの高解像度の微細パターンを形成することができる。このため、形成された微細パターンは、タンパク質や細胞の解析、医薬品の効果の検証などの用途のみならず、バイオセンサー、スイッチング素子、バイオリアクター、DNAチップ、人工臓器などの製造、さらにはニューロコンピュータなどの構想にも有用である。

【0064】本発明の区画培養基板は、DNAチップに有用である。DNAチップは基材表面に数μmから数十μmのオーダーの微細なパターンを形成し、そこに比較的に合成DNAを共有結合させて形成するもので、パターンの区画毎に複数数の予め知られた配列を有する異なるDNAを導入して形成されるものであり、このDNAの吸着領域を前記パターン形成方法により形成するものである。DNAの吸着には、先に述べた供給結合によるものとイオン結合によるものがあるが、本発明の知基親水性が変化するグラフトポリマーを使用する場合には、DNAとグラフトポリマーの相違点を選択することにより、いずれの方法にも適用することができるという利点を有する。なかでも、DNAにはリリン酸基が存在す

(13)

特開2003-9860

23

るため負電荷を有しており、親水的なカチオングラフと相互作用しやすいと考えられ、吸着強度の観点からも、イオン結合による吸着が有用である。本発明により得られたDNAチップは、解吸度に優れた微細なパターンを容易に形成することが可能であるため、遺伝子診断やDNAの未知の塩基配列の決定などの用途への展開が期待される。

【0065】

【実施例】以下、実施例により、本発明を詳細に説明す

(中間層塗布後)

・エポキシ樹脂(エポコート、Yuka-shell Co., Ltd.)	2 g
・紫外線吸収剤(1R125 相光純薬剤)	0.2 g
・1-メトキシ-2-プロパノール	9 g
・メチルエチルケトン	9 g

【0067】中間層を形成した支持体表面を次の条件にてプラズマ処理して表面グラフ重合による図形記録層の形成を行った。島津製作所製LCVD-01型プラズマ処理装置を用いて、0.4 torrのアルゴンガス雰囲気下にて10秒間処理後、空気に曝し、中間層表面にパーオキシ基を導入した。この膜を10wt%の α (スチレン-4-スルホニル)酢酸ナトリウム塩水溶液に浸漬し、15分間アルゴンガスをバブルしたのち、7時間60℃に加熱することによってグラフ重合を行った。グラフ重合後膜を3000mのイオン交換水中につけ、グラフ重合以外のホモポリマーを除去することによりプラズマ処理により表面にグラフ化された表面を備えた区画培養基基板Aを得た。

【0068】(パターン形成)得られた区画培養基基板Aを波長830nmの赤外光を発生する赤外線レーザー(ビーム径20 μ m)にて幅20 μ mの横状の露光を10 μ mの空白を隔てて基板の縦横に露光し、格子模様の露光パターンを形成した区画培養基基板Aを得た。露光後、培養細胞として牛血管内皮細胞を用い、培養方法としては、汎用の方法を用いて細胞培養を行った。区画培養基基板の表面に血管内皮細胞を 1×10^4 cells/mlに調整した細胞懸濁液を塗布し、37℃のCO₂インキュベーター内で24時間培養を行ったところ、格子模様の内側の正方形のパターンの細胞接着領域(未蒸光部領域)のみに内皮細胞が伸展・増殖しており、所望の細胞の配列パターンが得られた。

【0069】【実施例2】

(パターン形成材料の作製)188 μ mのコロニ処理された2軸延伸ポリエチレンテレフタレートフィルム(A4100、東洋紡(株)製)を用い、グロー処理として平坦マグネトロンスパッタリング装置(CFS-100-EF70、芝浦エレクトロニクス製)を使用し、下記条件で酸素グロー処理を行った。

【0070】

初期真空: 9×10^{-6} torr酸素圧力: 6.8×10^{-4} torr

* するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例1】

(区画培養基基板原板の作製)188 μ mのコロニ処理されたポリエチレンテレフタレートフィルムを支持体として用い、その表面に下記組成をロッド10番の塗布バーを使用して塗布し、100℃で1分乾燥し、厚度1.6 μ mの赤外線吸収剤を含有する中間層を作成した。

【0066】

RFグロー: 1.5 kw

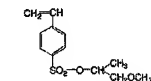
処理時間: 60 sec

【0071】次に、グロー処理したフィルム上に、下記例示モノマー(M-3)のメチルエチルケトン溶液(50wt%)を塗布し、100℃で1分乾燥し、UV光で照射(400W高圧水銀灯 30分)してグラフ重合を行い、グラフ層を形成した。さらに、下記構造の光熱変換色素(1R-A)の5重量%アセトニトリル溶液をロッドバー#7で塗布し、グラフ層に光熱変換色素を含有させて区画培養基基板Bを得た。

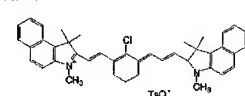
【0072】

【化14】

M-1



1R-A



【0073】(画像形成: パターン形成)得られた区画培養基基板Bを波長830nmの赤外光を発生する赤外線レーザー(ビーム径20 μ m)にて実施例1と同様に露光し、パターン形成された区画培養基基板Bを得た。露光後、区画培養基基板Bを用いて実施例1と同様の細胞培養を行ったところ、細胞接着領域(未蒸光部領域)のみに内皮細胞が伸展・増殖しており、露光領域の

(14)

特開2003-9860

25

26

固定により、所望の細胞の配列パターンが得られることがわかった。

【0074】

【発明の効果】本発明の区画培養基板は、蒸気或いは加熱により高厚膜、高解像度で、細胞の非吸着領域に好適本

的な高親水性の領域が容易に形成でき、しかも、赤外線レーザー等を操作することによりデジタルデータに基づいたパターン形成が可能であり、応用範囲が広いという優れた効果を奏し、これに応用することで、微細なパターン形成が可能でDNAチップを得ることができる。

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 CA01 CA11 HA11
4B029 AA01 AA21 AA23 BB11 BB20
CG02
4B065 AA90K BC41 BC50 CA44
CA46